

BEST AVAILABLE COPY

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/18, C07K 14/475, 16/22, C12N 5/10, A61K 38/22, 48/00, G01N 33/53, C12Q 1/68</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/22000 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. Mai 1999 (06.05.99)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/03155 (22) Internationales Anmeldedatum: 27. Oktober 1998 (27.10.98) (30) Prioritätsdaten: 197 47 418.7 27. Oktober 1997 (27.10.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): NIEHRS, Christof [DE/DE]; Klingenteichstrasse 6b, D-69117 Heidelberg (DE). GLINKA, Andrei [RU/DE]; Erlenweg 22, D-69126 Heidelberg (DE). (74) Anwalt: HUBER, Bernard; Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE)..</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>
<p>(54) Title: INHIBITOR PROTEIN OF THE WNT SIGNAL PATHWAY (54) Bezeichnung: INHIBITOR-PROTEIN DES WNT-SIGNALWEGS (57) Abstract An inhibitor protein of the wnt signal pathway, a DNA coding for such a protein and a process for preparing such a protein are disclosed, as well as the use of the DNA and protein and antibodies against said protein. (57) Zusammenfassung Die vorliegende Erfindung betrifft ein Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, eine ein solches Protein kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Proteins. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, eine ein solches Protein kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Proteins. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper.

5

Der wnt-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellproliferation und -Differenzierung während der Embryonal-Entwicklung von *Drosophila*, *Xenopus laevis* und der Maus. Der wnt-Signalweg umfaßt die Kombination von sekretorischen Glykoproteinen, die durch wnt-Gene, z.B. Xwnt-8, kodiert sind, und wnt-Rezeptoren, an die die Glykoproteine binden. Ferner ist der wnt-Signalweg beim Menschen kausal im Colon- und Mammakarzinom sowie dem Melanom impliziert (vgl. Peifer, M., Science 275, (1997), 1752-1753). Inhibitoren des wnt-Signalwegs könnten daher eine Möglichkeit darstellen, therapeutisch bei Tumorerkrankungen eingreifen zu können.

15

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem der wnt-Signalweg inhibiert werden kann.

20

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

25

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, wobei das Protein zumindest eine der in Fig. 1 angegebenen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II umfaßt.

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis des Anmelders, daß in Tieren, besonders Säugetieren, ganz besonders dem Menschen, ein Protein existiert, das den wnt-Signalweg inhibiert. Der Anmelder hat gefunden, daß die

- 2 -

Expression des wnt-Gens, Xwnt-8, in *Xenopus laevis* zur Ausbildung von Siamesischen Zwillingen führt. Diese Mißbildung wird verhindert, wenn gleichzeitig das vorstehende Protein exprimiert wird. Dieses Protein ist ein sekretorisches Protein von etwa 40 kD. Es weist zumindest eine der in Fig. 1 angegebenen Cysteinreichen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II auf. Varianten des Proteins sind in Form ihrer DNAs in Fig. 2 angegeben. Desweiteren hat der Anmelder erkannt, daß Varianten des Proteins in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden (vgl. Tabelle 1 und Fig. 3).

In der vorliegenden Erfindung wird vorstehendes Protein mit "wnt-Inhibitor" (wnt-I) bezeichnet.

In bevorzugter Ausführungsform weist (wnt-I) die in Fig. 1 angegebenen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II auf.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine für (wnt-I) kodierende Nukleinsäure. Diese kann eine RNA oder eine DNA sein. Letztere kann z.B. eine genomische DNA oder eine cDNA sein. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

- (a) die DNA von Fig. 2 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA,
- (b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA, oder
- (c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

Der Ausdruck "hybridisierende DNA" weist auf eine DNA hin, die unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA, mit einer DNA von (a) hybridisiert.

- 3 -

Die DNA von Fig. 2 umfaßt sieben DNAs, die aus *Xenopus laevis*, Maus, Mensch oder Huhn stammen und für (wnt-1) kodieren. Sechs dieser DNAs wurden bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) am 19. Sept. 1997 wie folgt hinterlegt:

5

Fig. 2.1 (DNA aus Mensch) als phdkk-3 unter DSM 11762

Fig. 2.2 (DNA aus Huhn) trägt die Bezeichnung pcdkk-3

Fig. 2.3 (DNA aus Maus) als pmdkk-2 unter DSM 11759

Fig. 2.4 (DNA aus Mensch) als phdkk-2 unter DSM 11761

10 Fig. 2.5 (DNA aus Maus) als pmdkk-1 unter DMS 11758

Fig. 2.6 (DNA aus Mensch) als phdkk-1 unter DSM 11760

Fig. 2.7 (DNA aus *Xenopus laevis*) als pRNdkk-1 unter DSM 11757

15

Nachstehend wird eine erfindungsgemäße DNA in Form einer cDNA beschrieben. Diese steht beispielhaft für jede unter die vorliegende Erfindung fallende DNA.

20

Zur Herstellung einer erfindungsgemäßen cDNA ist es günstig, von einer *Xenopus laevis*-cDNA-Bibliothek auszugehen (vgl. Glinka, A. et al., Mechanisms Develop. 60, (1996), 221-231). Von den einzelnen cDNA-Klonen werden mittels RNA-Polymerase entsprechende mRNAs synthetisiert. Diese werden zusammen mit mRNA von wnt-Genen, z.B. Xwnt-8, in *Xenopus laevis* mikroinjiziert. Es wird auf die Ausbildung von Siamesischen Zwillingen bei *Xenopus laevis* gescreent. Diese werden erhalten, wenn die mRNA des wnt-Gens alleine oder zusammen mit solcher *Xenopus laevis* mRNA mikroinjiziert wird, die nicht für (wnt-1) kodiert. Das Nicht-Auftreten von Siamesischen Zwillingen wird somit als Nachweis für das Vorliegen einer mRNA gewertet, die für (wnt-1) kodiert. Solch eine mRNA läßt unmittelbar die entsprechende cDNA erkennen.

25

30

Eine erfindungsgemäße cDNA kann in einem Vektor bzw. Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für *E. coli* sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu

nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4, anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

5 Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um eine, erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende cDNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E.coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21 und SG 13009, den Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae* und die tierischen Zellen L, 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und HeLa sowie die Insektenzellen sf9.

10 Der Fachmann weiß, in welcher Weise eine erfindungsgemäße cDNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese cDNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäße cDNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann.

15 Des weiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. trans-fizierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße cDNA exprimierte Protein zu isolieren und zu reinigen. Ein solches Protein, das auch ein Fusionsprotein sein kann, ist somit ebenfalls

20 Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehen-
des Protein bzw. Fusionsprotein gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper

25 kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit einem vorstehenden (Fusions)protein oder Fragmenten davon zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen (Fu-

30 sions)protein oder Fragmenten davon erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es, den wnt-Signalweg besser zu untersuchen und zu verstehen. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann (wnt-l) in Organismen nachgewiesen werden. Ferner kann mit einem erfindungsgemäßen (wnt-l) ein gegen dieses Protein gerichteter Autoantikörper nachgewiesen werden. Beide Nachweise können durch übliche Verfahren, insbesondere einen Western Blot, einen ELISA, eine Immunpräzipitation oder durch Immunfluoreszenz, erfolgen. Desweiteren kann mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA und hiervon abgeleiteten Primern, die Expression des für (wnt-l) kodierenden Gens nachgewiesen werden. Dieser Nachweis kann in üblicher Weise, insbesondere in einem Southern Blot, erfolgen.

Somit können mit der vorliegenden Erfindung auch Prozesse besser untersucht, d.h. diagnostiziert, und verstanden werden, die mit dem wnt-Signalweg zusammenhängen. Dies sind z.B. Zellproliferation und -Differenzierung sowie Erkrankungen verschiedenster Art. Beispiele von letzteren sind Erkrankungen des Auges und der Knochen sowie Tumorerkrankungen, insbesondere Colon- und Mammakarzinom sowie Melanom.

Desweiteren eignet sich die vorliegende Erfindung, Maßnahmen für und gegen das Vorliegen von (wnt-l) in Organismen zu ergreifen. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann (wnt-l) in Organismen inhibiert werden. Andererseits kann mit einem erfindungsgemäßen (wnt-l), insbesondere nach Kopplung an ein vom Körper nicht als fremd angesehenes Protein, z.B. Transferrin oder BSA, die Menge von (wnt-l) in Organismen erhöht werden. Entsprechendes kann auch mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA, erreicht werden, die unter die Kontrolle eines in bestimmten Geweben induzierbaren Promotors gestellt wird und nach ihrer Expression zur Bereitstellung von (wnt-l) in diesen Geweben führt. Darüberhinaus kann eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, insbesondere eine DNA, auch zur Inhibierung von (wnt-l) genutzt werden. Hierzu wird die Nukleinsäure, z.B. als Basis für die Erstellung von Anti-Sinn-Oligonukleotiden zur Expressions-Inhibierung des für (wnt-l) kodierenden Gens verwendet.

Somit stellt die vorliegende Erfindung auch die Möglichkeit bereit, in den wnt-Signalweg aktivierend bzw. inhibierend einzugreifen. Erstes könnte z.B. durch Verabreichung eines erfindungsgemäßen Antikörpers gegen (wnt-I) erfolgen. Für letzteres bietet sich an, erfindungsgemäßes (wnt-I) zu verabreichen. Die Aktivierung des wnt-Signalwegs könnte sinnvoll sein, wenn daran gedacht wird, Organismen für Organspende zu züchten. Die Inhibierung des wnt-Signalwegs bietet sich allerdings an, um therapeutisch bei Erkrankungen von Knochen und des Auges sowie bei Tumorerkrankungen, insbesondere Colon- und Mammakarzinomen sowie Melanom, eingreifen zu können.

Insbesondere zeichnet sich die vorliegende Erfindung dadurch aus, daß sie gewebespezifisch eingesetzt werden kann. Dies gilt sowohl für Diagnose als auch für Therapie. Beispielsweise eignet sich eine erfindungsgemäße DNA, DKK-1, ein entsprechendes Protein bzw. ein Antikörper davon besonders für Gewebe, wie Gehirn, Herz, Gefäße, Knochen, Knorpel, Bindegewebe und Auge. Ferner eignet sich eine erfindungsgemäße DNA, DKK-2, ein entsprechendes Protein bzw. ein Antikörper davon besonders für Gewebe, wie Gehirn, Herz, Gefäße, Knochen, Bindegewebe, Nieren, Hoden, Milz, Ovarien, Muskel, Uterus, Knorpel, Auge und Brustdrüse. Desweiteren eignet sich eine erfindungsgemäße DNA, DKK-3, ein entsprechendes Protein bzw. ein Antikörper davon, besonders für Gewebe, wie Gehirn, Herz, Gefäße, Knochen, Knorpel, Auge, Bindegewebe, Lunge, Ovarien, Muskel und Brustdrüse.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

Fig. 1 zeigt die Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II eines erfindungsgemäßen (wnt-I). Die Angabe "-" bedeutet eine Aminosäure, wobei die Zahl der Aminosäuren variabel ist, wenn sie einen Stern aufweisen,

Fig. 2 zeigt die Basensequenz von sieben (wnt-I) kodierenden DNAs mit Angabe der Basen, die zu den Aminosäure-Konsensus-Sequenzen

- 7 -

von (wnt-1) beitragen.

Fig. 3 zeigt die Expression von drei (wnt-1) kodierenden DNAs, DKK-1, DKK-2 und DKK-3, in Geweben.

5

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen (wnt-1)

10 Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen (wnt-1) wurde die DNA von Fig. 2.6, phdkk-1 mit Bam HI-Linkern versehen, anschließend mit Bam HI gespalten und in den mit Bam HI gespaltenen Expressionsvektors pQE-8 (Qiagen) inseriert. Es wurde das Expressionsplasmid pQ/wnt-1 erhalten. Ein solches kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspapartner) und einem erfindungsgemäßen (wnt-1) (C-Terminuspapartner). pQ/wnt-1 wurde zur Transformation von

15 E.coli SG 13009(vgl. Gottesman, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273) verwendet. Die Bakterien wurden in einem LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin und 25µg/ml Kanamycin kultiviert und 4 h mit 60µM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wurde eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wurde mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M Harnstoff entsprechend der

20 Angaben des Herstellers (Diagen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wurde in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach seiner Neutralisierung wurde das Fusionsprotein einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).

25

Es zeigte sich, daß ein erfindungsgemäßes (Fusions)protein in hochreiner Form hergestellt werden kann.

30 **Beispiel 2: Herstellung und Nachweis eines erfindungsgemäßen Antikörpers**
Ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 wurde einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M

- 8 -

Natriumacetat wurde eine ca. 40 kD Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stücke wurden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgte, bestimmt wurde. Mit dem Gel-gereinigten Fusionsprotein wurden Tiere wie folgt immunisiert:

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen

Pro Immunisierung wurden 35 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 14: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 28: 3. Immunisierung (icFA)
Tag 56: 4. Immunisierung (icFA)
Tag 80: Ausbluten

Das Serum des Kaninchens wurde im Immunoblot getestet. Hierzu wurde ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Die Western Blot-Analyse wurde wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wurde das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper war das Serum des Kaninchens (1:10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten mit PBS wurde das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper war ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1:5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgten mehrere Waschschriffe mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung (36 µM 5' Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400 µM Nitroblau-tetrazolium, 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar waren.

- 9 -

Es zeigte sich, daß erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden können.

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn

- 5 Pro Immunisierung wurden 40 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,8 ml PBS und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
10 Tag 50: 3. Immunisierung (icFA)

Aus Eigelb wurden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es wurden erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper nachgewiesen.

15 **Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus**

Pro Immunisierung wurden 12 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung war das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.

- 20 Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 56: 3. Immunisierung (icFA)
Tag 84: 4. Immunisierung (PBS)
Tag 87: Fusion

25

Überstände von Hybridomen wurden im Western Blot getestet. Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper wurden nachgewiesen.

30

Tabelle 1: Expression von erfindungsgemäßen DNAs in Mausembryonen

	Dkk-1	Dkk-2	Dkk-3
Neuroepithelium			
E9.5 diencephalon	+++ ventral	+++ medial	+ medial
E12.5	telencephalon M/manlie	hypothalamus	telencephalon M/ ventricular zone
Eye	pigmented epithelium	choroid	retina
Spinal cord	-/+		ventricular zone Roof plate
Mesoderm:			
Heart E10	bulbis cordis Endocardium septum transversum		myocardium
Heart E12	endocardial cushion	endothelium endothelium	endothelium endocardial cushion
Blood vessels	+++ aorta	+++ pulmonary artery	+++ aorta + pulmonary artery
Limb bud mesenchyme	E9 S	I	D
Bone E12	perichondrium	S /mesenchyme	perichondrium I/mesenchyme

- 11 -

Bone E15			
Urogenital	Ossification centers		
	nephric duct		
	S-shaped body		
	Comma shaped body		
Palate	+++	++	+
Hair follicle	+++ mesenchyme + epithelium	+	+
Tooth mesenchyme	-	-	+++
Trunk mesoderm	+/-	+++	++

Legende: Mesoderm: (D) deep, (I) intermediate (L) lateral, (M) medial, (S), superficial.
 Expressionshöhe: (-) absence, (+/-) very weak expression, (+) medium, (++) strong, (+++) very strong.

Patentansprüche

- 5 1. Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, wobei das Protein zumindest eine
 der in Fig. 1 angegebenen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II
 umfaßt.
- 10 2. Protein nach Anspruch 1, wobei das Protein die Aminosäure-Konsensus-
 Sequenzen I und II umfaßt.
3. DNA, kodierend für das Protein nach Anspruch 1 oder 2.
- 15 4. DNA nach Anspruch 3, wobei die DNA umfaßt:
 (a) die DNA von Fig. 2 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Ba-
 senpaare unterschiedliche DNA,
 (b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA oder
 (c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten geneti-
 schen Code verwandte DNA.
- 20 5. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 3 oder 4.
6. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 5.
- 25 7. Verfahren zur Herstellung des Proteins nach Anspruch 1 oder 2, umfas-
 send die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 6 unter geeigne-
 ten Bedingungen.
- 30 8. Antikörper, gerichtet gegen das Protein nach Anspruch 1 oder 2.
9. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 oder 2 als Reagens zur Dia-
 gnose und/oder Therapie.

10. Verwendung der DNA nach Anspruch 3 oder 4 als Reagens zur Diagnose und/oder Therapie.

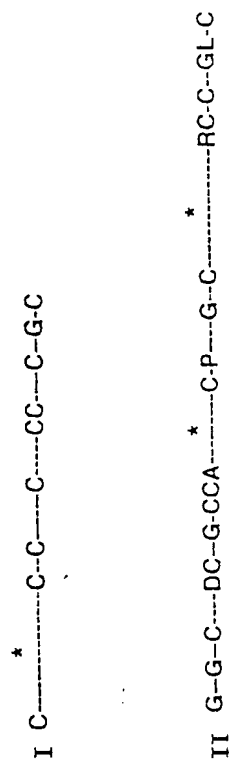


Fig. 1

Fig. 2

[illegible]

phdck-3
pcdck-3
pmcdk-2
phdck-2
pmcdk-1
phdck-1
p2Ncdk-1

[illegible]

phdck-3
pcdck-3
pindck-2
phdck-2
pindck-1
phdck-1
pl2Ncdck-1

[illegible]

Fig. 2 (Forts.)

312	CTGCTAAAGC	ATCATCA6AAGTGAACCTGGCAAACTTAC	CTCCAGCTATCACCAATGAGA	phdtk-3
294	GGGCA	AAATACTGTCA6AAGTAAACTTTGA	AACTTACCTCCACCTAACCAATGAGT	pcdtk-3
106	GCCACAGTCCCA	CAAGGTTCTTCAGCTTGCA	pmck-2
67	GCCACAGTCCCA	CAAGGATCTTCAGCTTGCA	phdtk-2
329	GCTCCAGCCCA	AGCCGCGGCAAGCCGCGTTCGAGGTTGTA	AGATCTGTC	pmck-1
314	GCGCTAGTCCCA	CCCCGCGGAGGCGGACCCGCGCGTG	CAAACTCTGTC	phdtk-1
361	GTCACAGTCCCAGAAATGGCAACTCT	CTGGCTTGCA	phdtk-1
			CTGGCAATGCG	prNdkk-1
372	CCAAACACAGACA	CGAAGGTTGGAAATATAA	ATCCATGTGCTACCGAGAAATTCACAAG	phdtk-3
304	CCAAACACAGAAA	CCAGAAATGGTAATAA	AACTGTTCAGACTCTCAAGAAATTTGAT	pcdtk-3
198	GGAGGAAAGAA	ACGATGACACAGAGAA	GGATGGTTTACCCCTTGCAAT	pmck-2
109	GGAGGAAAGAA	AGGCTGACACAGAGAA	GGATGGTTTACCCCTTGCAAT	phdtk-2
389	GAAGGCGCAGGA	AGGCTGATGACGACGCT	ATGTGCTGCGCCGAGAACTAC	pmck-1
371	GGAGGCGCAGGA	AGGCTGATGACGACGCT	ATGTGCTGCGCCGAGAACTAC	phdtk-1
406	GGAGGCGCAGGA	AGGCTGATGACGACGCT	ATGTGCTGCGCCGAGAACTAC	prNdkk-1
432	T	phdtk-3
364	T	pcdtk-3
208	ATGGAAT	CTGCAATGCACTGAGAGCAATCTTCCGAGACAA	TTTTCGAGACAAATTTACATCTATAAAG	pmck-2
169	ATGGAAT	CTGCAATGCACTGAGAGCAATCTTCCGAGACAA	TTTTCGAGACAAATTTACATCTATAAAG	phdtk-2
449	ATGGAAT	CTGCAATGCACTGAGAGCAATCTTCCGAGACAA	TTTTCGAGACAAATTTACATCTATAAAG	pmck-1
431	ATGGAAT	CTGCAATGCACTGAGAGCAATCTTCCGAGACAA	TTTTCGAGACAAATTTACATCTATAAAG	phdtk-1
466	ATGGAAT	CTGCAATGCACTGAGAGCAATCTTCCGAGACAA	TTTTCGAGACAAATTTACATCTATAAAG	prNdkk-1

Fig. 2 (Forts.)

433
424
265
226
500
479
526

GTGGAGAAACAAAGAAATCATGAGTGTATCATTTGATGAAAGACTGTGAAACAGGAAAGT
ATGGCAACCCGGCATAGWGAATCGCAACCACTATTTCCAAACCATGACCTGGGATATGGC
ATGGTATCTGGGCACAGWGAATCGAAACCACTTACTTCAAACCCATGACITGGGATATGGC
AGAAAGCATCATTTGAAGAACCTTGGTATATGACCACTACGCTCCGCGCGGGGGAATGGATATC
AGGAAACCATCATCTGAAGGCTTTGGTATATGATCATAGCACTC...TTGGATATGGGATATT
AAGAAACCATCTCGGAAWACATATAATAATGCTGATCATGCT...AACCAATGGAACTACTATT

phdtkk-3
pcdtkk-3
pmakk-2
phdtkk-2
pmdtkk-1
phdtkk-1
pRNdtkk-1

433
484
325
286
560
535
383

.....
ATTGCCAGTTCCTCCACCTTTTGAATATCAAGTGTCTAGCCCTGTAAACCCAGGCATACACACAT
A6AATCTAGGGAAAGGGCCACACATCCAAAGATGCCCTCAATATAAAGGGACATGGAAAGGACCCAT
A6AATCTAGGAAAGGACCCACACACATAAAGATGTCACATATATAAAGGGGCAAGAAAGGACCCCA
CCAGAAAGAAACAGCACTGACTTCAAAAGATATATGACACCAAGGGACAAAGAAAGGCGICG
CCAGAAAGAAACCACTTGTCTCAAAAATGTAATACACCCAAAGGGACAAAGAAAGGATCTGTT
CCAAATTAACCAACGTCCTCCATCTGGAAAGCAAGTCTTTAAAGGGCCGAGAGGAGATGTT

phrkk-3
pcdkk-3
pmckk-2
phrkk-2
pmckk-1
phdkk-1
pRNdkk-1

[illegible]

Fig. 2 (Forts.)

phdkk-3
pcdkk-3
pmckk-2
phdkk-2
pmdkk-1
phvdkk-1
cd2Ndkk-1

phdck-3
pcdk-3
pndck-2
phdck-2
pndck-1
phdck-1
sfNcdck-1

433
723
565
526
800
773
823

Fig. 2 (Forts.)

7/11

phdkk-3
 pcdkk-3
 pmdkk-2
 phdkk-2
 pmdkk-1
 phdkk-1
 pRNdkk-1

433
 783 CCTGATGGAGTACTAGAGCGCTGCCCATGTGCAAGTGGCTTGAICITGCCAACCTCAGAGC
 619 AAACACTG.GAAGAGTCATCAGTACGAGACTGTGAATTTGTGTATTTAAAGCAATTATGGC
 580 CACCATTTGAGGAACATCATCAATTCAGAGCTGTGAAGTTGTGTATTTAAAGCAATTATAGC
 856ACCGACAGTC..IAAAATATGATGGACTCTTTTATCTAAATATATGCTACGAAAAATC
 829
 883 CGAGGCCCTACAGAG..CCTGAAGGACCTTCTCTAAATTAAGCTAAATTAAGACITTGGTAC

phdkk-3
 pcdkk-3
 pmdkk-2
 phdkk-2
 pmdkk-1
 phdkk-1
 pRNdkk-1

433
 843 AGCCACAGTACTACATCTGTGTGTGAACTGTCTCCATGAAACCCAGGAAACGAAACAA
 678 ATGATGGAAACCTGGATTGGAAATGCGGAAGAAATGAGGGATGTGGTAAGAAATGTGGAGGCAAG
 640 ATGGTGGAAATTAAGGTTTCAGATGCGAGAAAGAAAT...GGCTAAATTAAGAAACGTTGAATAAG
 910 CTTTATGATTTGTTCAGCTCAATCCCAAGGATGTAGGAAATCTTCAGTGTGTAATTAAGCAT
 829
 941 CTGCAATGTTATTTTCTCAGTTTACATGAAGTGTCTCTGCTCTCCCTGAAACCCGGAATGCTG

phdkk-3
 pcdkk-3
 pmdkk-2
 phdkk-2
 pmdkk-1
 phdkk-1
 pRNdkk-1

433
 903 GAAGATCCCTTGAACATGGATGAGATGCCATTTTAICAGTTTAAIACCCAGAGATATCTT
 738 AAGAGGGCCAGGACTGAAATCAAGTAGAGTCGACAAACCAAGIACIACCCAGTGGCTCCG
 697 AATATAGATGATCACAATAAATAAATAAAGATGCGGCCCAAGCTTATCCCCITTA
 970 TCCGACAATACTTTCCAAAGCTCTGGAAGTGTAAAGGACTTTGTTCCTTGAAGAACCTCC
 829
 1001 CGCAACTTGTTCCTTTTGTGAGGAACTTCCCTAAATTAAGCTAAATTAAGCTAAATTAAGCT

Fig. 2 (Forts.)

8/11

433	phdtk-3
963	TCTGATTACGAAAGCAAGGTCATTCAGGAAGTGCCTAAAGAAATAGAAAGCCCTGGAG	pcdtk-3
798	TTATGTGCCCTCATCTAAGTAAATAATGTACACATTTGTGAAAAATGCTAATTATTAAGAAAGAA	pmdtk-2
757	GTGAGGGTTAAT	phdtk-2
1030	CTGTGATTGCAGTAAATTAACCTGTGTGTAATCCCTCAGTGTGGCACCTACCTGTAAATGCTC	pmdtk-1
829	phdtk-1
1061	TGTTGTAAATATACGCAAGGAGAGACCTGTAAAAACTGTAAATACCCGTGTATAGAAAGTG	pRNdtk-1
433	phdtk-3
1023	GACCAAGCAGGTGTGAAGTCTGAGCATGACCCGGCTCATGACCTAATTTCTGGGAGATGAA	pcdtk-3
858	AGCACACCATGGAAATTACAAAAA	pmdtk-2
769	phdtk-2
1090	AGCAAAACCTTTTAATTATTTCTAGAGGTGTGTACATTTGCCCTTGTTCCTTGGCATGT	pmdtk-1
829	phdtk-1
1121	TACATGATCTTCTCTATTGTAACTGCCCACCTTGTACATTTCCGACGCGCTCTTCCCTTTT	pRNdtk-1
433	phdtk-3
1083	ATATGAAGTTCAAAACACACCAAGTTTAAAGTTAGTCCCTAGAAATTTGTGTCTAGTGTCTTGTCTTA	pcdtk-3
882	pmdtk-2
769	phdtk-2
1150	AAATTTTCTTGTGCACGGTTGATTTGTCTTGAATCAATAAAATTTCTAATAATGGAGTAgAA	pmdtk-1
829	phdtk-1
1181	TATATATATATATATAAATATATATATATATATATATATGTAAGATTTTACGGCTAGTATGTCTG	pRNdtk-1

Fig. 2 (Forts.)

9/11

433	phdtkk-3
1143	CATACACCCCTTAACAGATACTGCTGGATAGAAAGTGAATTAACAATCTTCATTGAGCATCC	pcdtkk-3
882	pmdtkk-2
769	phdtkk-2
1210	AAAAAAAAAAAAAAAA	pmdtkk-1
829	phdtkk-1
1241	IATTTTAAATGAATTAACAATTTCTAAACTTAAAAACAATAAAAAAAAAAAAA	plRNdtkk-1
433	phdtkk-3
1203	GTTTTCGTGCACCAACCTGCAATGTTCAAAATCAATGTTGAATTCACATCAATCTTGGACCC	pcdtkk-3
882	pmdtkk-2
769	phdtkk-2
1227	pmdtkk-1
829	phdtkk-1
1298	plRNdtkk-1
433	phdtkk-3
1263	AAACTTTCCATCAAAAGACAAAATGAGAAAAG6CATCAGTGTTCCTTGGATTAATCCTTTC	pcdtkk-3
882	pmdtkk-2
769	phdtkk-2
1227	pmdtkk-1
829	phdtkk-1
1298	plRNdtkk-1

Fig. 2 (Forts.)

10/11

phdtk-3
pcdtk-3
pmdtk-2
phdtk-2
pmdtk-1
phdtk-1
pRNdtk-1

phdtk-3
pcdtk-3
pmdtk-2
phdtk-2
pmdtk-1
phdtk-1
pRNdtk-1

433
1323 CTTGTACAGCAGAAATAAACGTATCAGTACTCGTACTCAITAAAAAACAACACGAGGCA
882
769
1227
829
1298

433
1383 T
882
769
1227
829
1298

Fig. 2 (Forts.)

11/11

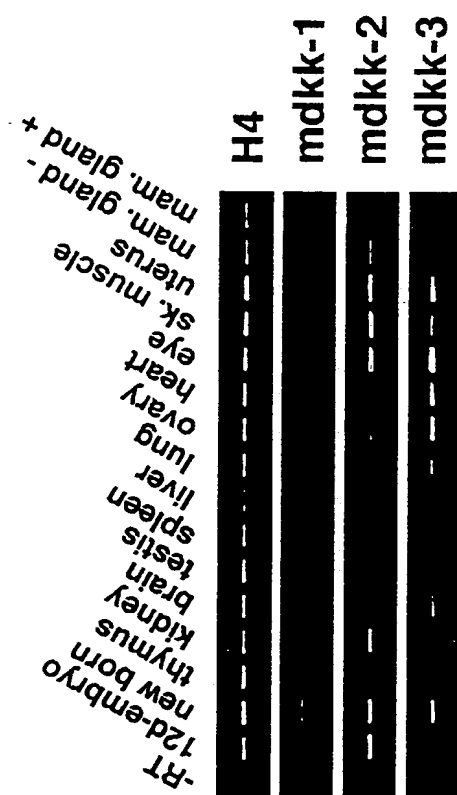


Fig. 3

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Deutsches Krebsforschungszentrum
- (B) STRASSE: Im Neuenheimer Feld 280
- (C) ORT: Heidelberg
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 69120

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Inhibitorprotein des wnt-Signalwegs

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 7

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30(EPA)

(v) DATEN DER VORANMELDUNG:

ANMELDENUMMER: DE 19747418.7

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1297 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GACAGTCGGA GCGGCGCTG CAGCATCAA GGGACTTATC TTGGAGGACT TGTGAATTCT	60
CATCCTGCCA TTGTGGTTAC TGAGTCTGGT TGGACAGAGG AATGGGCAGC AACATGTTCC	120
CGGTGCCTCT TATTGTCTTT TGGGGTTTTA TCTTGGATGG GGCAGTTGGC TTGTGCATGA	180
TGACCAACTC CAACTCCATC AAGAATGTGC CGGCGGCACC AGCAGGTCAG CCCATTGGCT	240
ACTACCTGT GAGCGTCAGT CCGGACTCCC TATATGATAT TGCCAACAAG TACCAACCTC	300
TGGATGCCTA CCGCTCTAC AGTTGCACGG AAGATGATGA CTGTGCCCTT GATGAATTCT	360
GTCACAGTTC CAGAAACGGC AACTCTCTGG TTTGCTTGGC ATGCCGAAA CGCAGAAAGC	420
GTTCCTGAG GGACGCCATG TGCTGCACAG GCAACTACTG TAGCAACGGA ATTTGTGTCC	480
CTGTGGAGCA AGATCAAGAG CGCTTCCAAC ACCAGGGATA CCTGGAAGAA ACCATTCTGG	540
AAAACTATAA TAATGCTGAT CATGCAACAA TGGATACTCA TTCCAAATTA ACCACGTCCC	600

2

CATCTGGAAT GCAGCCCTTT AAAGGCCGTG ATGGTGATGT TTGCCTCCGA TCAACTGACT	660
GTGCGCCAGG TCTATGCTGT GCCCGTCATT TCTGGTCAAA GATCTGCAAG CCGGTCCTTG	720
ATGAAGGCCA AGTGTGCACC AAGCACAGGA GGAAAGGCTC TCACGGGCTA GAGATTTTCC	780
AGCGTTGTCA CTGCGGTGCC GGACTCTCGT GCCGGTTACA GAAAGGAGAA TTTACAAC TG	840
TCCCTAAAC ATCGAGACTT CACACTTGCC AAAGACACTA AGCGAGGCCT ACAGAGCCTG	900
AAGGACCTTC TCTAAATTAA GCTAATTAAG ACTTTGGTAC CTGCATGTTA TTTTCTCAGT	960
TTACATGAAG TGCTCTGGTC TTCCCTGAAC CCGGAAGCTG CGCAACTTGT TTCTTTTTTT	1020
GAGGAACCTC CTAATTAATG CTAATTACAG TAAATTACTG TGTGTAAAT ACTACGCAAG	1080
GAGACCTGTA AAAACTGTAA ATACCCGTGT ATAGAAAGTG TACATGATCT TCTCTATTGT	1140
AACCTGCCAC CTTGTACATT CCGACGCGCT CTTCCCTTTT TATATATATA TATATATAAA	1200
TATATATTAT ATTATGTAGA GTTTACGTCT AGTATGTCTG TATTTTAAAT TGAAATAAAA	1260
CATTTCTAAA CTTAAAAACA AAAAAAAAAA AAAAAA	1297

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 881 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

TGCAGGCATG AACAAAGGACT GGGTTCGGCG GCAGTGAGAA GGGCAAAGC CTGGGGCAGG	60
CCTACCCCTG CAGCAGTGAT AAGGAATGTG AAGTTGGAAG ATACTGCCAC AGTCCCCACC	120
AAGGTTTCATC AGCCTGCATG CTCTGTAGGA GGAAAAAGAA ACGATGCCAC AGAGATGGGA	180
TGTGTTGCCC TGGTACCCGC TGCAATAATG GAATCTGCAT CCCAGTCACT GAGAGCATCC	240
TCACCCCA TATCCAGCT CTGGATGGCA CCGGCATAG AGATCGCAAC CATGGTCACT	300
ATTCCAACCA TGACCTGGGA TGGCAGAATC TAGGAAGGCC AACTCCAAG ATGCCTCATA	360
TAAAGGACA TGAAGGAGAC CCATGCCTAC GGTATCAGA CTGCATTGAT GGGTTTGTGTT	420
GTGCTCGCCA CTTCTGGACC AAAATCTGCA AACCAGTGCT CCATCAGGGG GAAGTCTGTA	480
CCAAACAACG CAAGAAGGGT TCGCACGGGC TGGAGATTTT CCAGAGGTGT GACTGTGCAA	540
AGGGCCTGTC CTGCAAAGTG TGGAAAGATG CCACCTACTC TTCAAAGCC AGACTCCATG	600
TATGCCAGAA GATCTGATAA AACTGGAAG AGTCATCACT AGCAGACTGT GAATTTGTGT	660

3

ATTTAATGCA TTATGGCATG ATGGAAACCT GGATTGGAAT GCGGAAGAAT GAGGGATGTG	720
GTAAGAATGT GGAGCAGAAG AGGGCAGGAC TGAATCAACT AGAGTCGACA ACAACCAAAG	780
TACTACCAGT GCTTCCGTTA TGTGCCTCAT CTATGTAAAT AATGTACACA TTTGTGAAAA	840
TGCTATTATT AAAAGAAAGC ACACCATGGA AATTACAAAA A	881

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 1226 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GACCCACGCG TCCGTGCCTG TTTGCGTCCT TCGGAGATGA TGGTTGTGTG TGCACCGGCA	60
GCTGTCCGGT TCTTGGCCGT GTTTACAATG ATGGCTCTCT GCAGCCTCCC TCTGCTAGGA	120
GCCAGTGCCA CCTTGAAGTC AGTTCTCATC AATTCCAACG CGATCAAGAA CCTGCCCCCA	180
CCGCTGGGTG GTGCTGGGGG GCAGCCGGGC TCTGCTGTCA GTGTGGCGCC GGGAGTTCTC	240
TATGAGGGCG GGAACAAGTA CCAGACTCTT GACAACTACC AGCCCTACCC TTGCGCTGAA	300
GATGAGGAGT GCGSCTCTGA CGAGTACTGC TCCAGCCCCA GCCGCGGGGC AGCCGGCGTC	360
GGAGGTGTAC AGATCTGTCT GGCTTGCCGA AAGCGCAGGA AGCGCTGCAT GACGCACGCT	420
ATGTGCTGCC CCGGGAAGTA CTGCAAAAAT GGAATATGCA TGCCCTCTGA CCACAGCCAT	480
TTTCCTCGAG GGGAAATTGA GGAAGCATC ATTGAAAACC TTGGTAATGA CCACAACGCC	540
GCCGCGGGGG ATGGATATCC CAGAAGAACC AACTGACTT CAAAAATATA TCACACCAAA	600
GGACAAGAAG GCTCCGTCTG CCTCCGATCA TCAGACTGTG CCGCAGGSCT GTGTTGTGCA	660
AGACACTTCT GGTCCAAGAT CTGTAAACCT GTCCTTAAAG AAGGTCAGGT GTGCACCAAG	720
CACAAACGGA AAGGCTCCCA CGGGCTGGAG ATATTCCAGC GCTGTTACTG CGGGGAAGGC	780
CTGGCTTGCA GGATACAGAA AGATCACCAT CAAGCCAGCA ATTCTTCTAG GCTCCACACC	840
TGCCAGAGAC ACTAAACCGA CAGTCTAAAT ATGATGGACT CTTTTTATCT AATATATGCT	900
ACGAAAATCC TTTATGATTT GTCAGCTCAA TCCCAAGGAT GTAGGAATCT TCAGTGTGTA	960
ATTAAGCATT CCGACAATAC TTTCCAAAAG CTCTGGAGTG TAAGGACTTT GTTCTTGAT	1020
GGAAGTCCCC TGTGATTGCA GTAAATTACT GTGTTGTAAT TCCTCAGTGT GGCAGTTACC	1080
TGTAAATGCA GCAAACTTT TAATTATTTT TCTAGAGGTG TGGTACATTC CTTGTTTCT	1140

4

CTTGCATGTA AATTTTTTTT GTACACGGTT GATTGTCTTG ACTCATAAAT ATTCTATATT 1200
 GGAGTAGAAA AAAAAAAAAA AAAAAA 1226

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 768 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

ATACGACTCA CTATAGGGAA TTTGGCCCTC GAGGCCAAGA ATTCGGCACG AGGGTTGGGA 60
 GGTATTGCCA CAGTCCCCAC CAAGGATCAT CGGCCTGCAT GGTGTGTCGG AGAAAAAAGA 120
 AGCGCTGCCA CCGAGATGGC ATGTGCTGCC CCAGTACCCG CTGCAATAAT GGCATCTGTA 180
 TCCCAGTTAC TGAAAGCATC TTAACCCCTC ACATCCCGGC TCTGGATGGT ACTCGGCACA 240
 GAGATCGAAA CCACGGTCAT TACTCAAACC ATGACTTGGG ATGGCAGAAT CTAGGAAGAC 300
 CACACACTAA GATGTCACAT ATAAAAGGGC ATGAAGGAGA CCCCTGCCTA CGATCATCAG 360
 ACTGCATTGA AGGGTTTTGC TGTGCTCGTC ATTTCTGGAC CAAAATCTGC AAACCAGTGC 420
 TCCATCAGGG GGAAGTCTGT ACCAAACAAC GCAAGAAGGG TTCTCATGGG CTGGAAATTT 480
 TCCAGCGTTG CGACTGTGCG AAGGGCCTGT CTTGCAAAGT ATGGAAAGAT GCCACCTACT 540
 CCTCCAAAGC CAGACTCCAT GTGTGTCAGA AAATTTGATC ACCATTGAGG AACATCATCA 600
 ATTGCAGACT GTGAAGTTGT GTATTTAATG CATTATAGCA TGGTGGAAAA TAAGGTTTCA 660
 ATGCAGAAGA ATGSCTAAAA TAAGAAACGT GATAAGAATA TAGATGATCA CAAAAAAAAA 720
 AAAAAAAAAA ATGCGGCCGC AAGCTTATTC CCTTTAGTGA GGGTTAAT 768

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 828 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

TGGCCCCGCA CGCCAAAAAT TCGGCACGAG GGTCTGGCAC TCAGAGGATG CTCTGACCTT	60
GAAAGGGTCC TATCTGGAGA CGAGGGAGTA CAACGTGCTG AATGTGTGCG GTTCAGGGAG	120
CATTTGCTAA CCCTGCATTT GGGAGCAGTG GGCACAAACC GGTTTTGGAG AGGTGGACAC	180
ATAAGGACTG TGATCAGCGC CCGGGTCCAA GAGGGCGGGT ACCTGGACCT CTGGGTGCCT	240
CACCCTCTCC CCGAACCCCT CCCACAGCCG TACCCGTGCG CAGAGGACGA GGAGTGC	300
ACTGATGAGT ACTGCGCTAG TCCCACCCCG CGGAGGGGAC CGCCGGCCGT GCAAATCTGT	360
CTCGCCTSCA GGAAGCGCCG AAAACGCTGC ATGCGTCACG CTATGTGCTG CCCC	420
TACTGCAAAA ATGGAATATG TGTGTCTTCT GATCAAAATC ATTTCCGAGG AGAAATTGAG	480
GAAACCATCA CTGAAAGCTT TGGTAATGAT CATAGCACCT TGGATGGGTA TTCCAGAAGA	540
ACCACCTTGT CTCAAAAAAT GTATCACACC AAAGGACAAG AAGGTTCTGT TTGTCTCCGG	600
TCATCAGACT GTGCCTCAGG ATTGTGTTGT GCTAGACACT TCTGGTCCAA GATCTGTAAA	660
CCTGTCTTGA AAGAAGGTCA AGTGTGTACC AAGCATAGGA GAAAAGGCTC TCATGGACTA	720
GAAATATTCC AGCGTTGTTA CTGTGGAGAA GGTCTGTCTT GCCGGATACA GAAAGATCAC	780
CATCAAGCCA GTAATTCTTC TAGGCTTCAC ACTTGTCAGA GACACTAA	828

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 432 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

GCGGTGGCGG CCGCTCTAGA ATAGTGGATC CCCC	60
GTGCGGCGC AGAGCGGAGA TGCAGCGGCT TGGGCCACCC TGCTGTGCCT	120
GCGGCGGTCC CCACGGCCCC CGCGCCCGCT CCGACGGCGA CCTCGGCTCC	180
GGCCCCGCTC TCAGCTACCC GCAGGAGGAG GCCACCTCA ATGAGATGTT	240
GGAAGTATG GAGGACACGC AGCACAAATT GCGCAGCGCG GTGGAAGAGA	300
AGAAGCTGCT GCTAAAGCAA TCATCAGAAG TGAACCTGGC AACTTACCT	360
ACAATGAGAC CAACACAGAC ACGAAGGTTG GAAATAATAA CCATCCATGT	420
ATTCACAAGT TT	432

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 1383 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

CGGCGAGCGG CAGCGGCGGC TGAGGAGCGC CGGGGATGCG GCGGGGAGAG GGACCGGCGC	60
CGCGGCGGCG ATGGCTGCTG CTGTTGGCCG TGCTGGCGGC TCTGTGCTGC GCCGCGGCCG	120
GGAGCGGCGG GCGGCGGCGA GCGGCCAGCC TGGGCGAGAT GCTGCGGGAG GTGGAGGCGC	180
TGATGGAGGA CACGCAGCAC AAGCTGCGCA ACGCCGTGCA GGAGATGGAA GCTGAAGAAG	240
AAGGGGCAAA AAAACTGTCA GAAGTAACT TTGAAAACCT ACCTCCCACC TACCATAATG	300
AGTCCAACAC AGAAACCAGA ATTGGTAATA AAAGTGTCA GACTCATCAA GAAATTGATA	360
AGGTTACAGA TAACAGAACT GGATCAACAA TTTTTCCTGA GACAATTATT ACATCTATAA	420
AGGGTGGAGA AAACAAAAGA AATCATGAGT GTATCATTGA TGAAGACTGT GAAACAGGAA	480
AGTATTGCCA GTTCTCCACC TTTGAATACA AGTGTGAGCC CTGTAAAACC CAGCATAAC	540
ACTGCTCAGC AGATGTTGAA TGCTGCGGAG ACCAGCTTTG TGTTTGGGGT GAGTGCAGGA	600
AAGCCACTTC AAGAGGAGAA AATGGTACCA TTTGTGAGAA CCAACATGAC TGCAACCCAG	660
GAACGTGCTG TGCTTTTCAG AAAGAACTGC TGTTTCCTGT GTGCACTCCG TTACCCGAAG	720
AAGGTGAACC TTGCCATGAT CCTTCAAACA GACTTCTCAA CCTGATCACC TGGGAACTGG	780
AACCTGATGG AGTACTAGAG CGCTGCCCAT GTGCAAGTGG CTTGATCTGC CAACCTCAGA	840
GCAGCCACAG TACTACATCT GTGTGTGAAC TGTCTCCAA TGAAACCAGG AAAAACGAAA	900
AAGAAGATCC CTTGAACATG GATGAGATGC CATTTATCAG TTTAATACCC AGAGATATTC	960
TTTCTGATTA CGAAGAAAGC AGCGTCATTC AGGAAGTGC TAAAGAATTA GAAAGCCTGG	1020
AGGACCAAGC AGGTGTGAAG TCTGAGCATG ACCCGGCTCA TGACCTATTT CTGGGAGATG	1080
AAATATGAAG TTCAAACACC AGTTTAGTTA GTCCTAGAAA TTGTTGTCTA GTGTCTTGCT	1140
TACATACACC CTTAACAGAT ACTGCTGGAT AGAAGTGCAA TAAACATCTT CATTGAGCAT	1200
CCGTTTTCGT GCACCAAACC TGCATGTTCA AATTCATGTT GAATTCATC AATCTTTGGA	1260
CCAAACTTTC CATCAAAGAC AAATGAGAAA GGCATCAGTG TTTCTTTGG ATTAATCCTT	1320
TCCTTTGTAC AGCAGAAATA AACGTATCAG TACTCGTACT CATTAAAAAA ACACACGGAG	1380

WO 99/22000

7

PCT/DE98/03155

CAT

1383

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 98/03155

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/18 C07K14/475 C07K16/22 C12N5/10 A61K38/22
A61K48/00 G01N33/53 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SAWADA K ET AL: - "Characterization of terminally differentiated cell state by categorizing cDNA clones derived from chicken lens fibers." INT J DEV BIOL, JUN 1996, 40 (3) P531-5, XP002096086 SPAIN see the whole document	3,4
X	-& EMVRT DATABASE Accession number D26311 29-JUL-1994 (Rel. 40, Created) Sawada K XP002096089 see the whole document ---	3,4
	--- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 March 1999

Date of mailing of the international search report

23/03/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gurdjian, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 98/03155

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GLINKA A ET AL: "Head induction by simultaneous repression of Bmp and Wnt signalling in Xenopus." NATURE, OCT 2 1997, 389 (6650) P517-9, XP002096087 ENGLAND see the whole document -----	1-10
P,X	GLINKA, ANDREI ET AL: "Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction" NATURE (LONDON) (1998), 391(6665), 357-362 CODEN: NATUAS;ISSN: 0028-0836, XP002096088 see the whole document -----	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DE 98/03155

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Remark: Although claims 9, 10 relate to a method for treating the human/animal body insofar as they relate to an in vivo method, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/03155

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 C12N15/18 C07K14/475 C07K16/22 C12N5/10 A61K38/22 A61K48/00 G01N33/53 C12Q1/68					
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK					
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C07K C12N					
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen					
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)					
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN					
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile				Betr. Anspruch Nr.
X	SAWADA K ET AL: "Characterization of terminally differentiated cell state by categorizing cDNA clones derived from chicken lens fibers." INT J DEV BIOL, JUN 1996, 40 (3) P531-5, XP002096086 SPAIN siehe das ganze Dokument				3,4
X	-& EMVRT DATABASE Accession number D26311 29-JUL-1994 (Rel. 40, Created) Sawada K XP002096089 siehe das ganze Dokument --- -/--				3,4
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie					
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist					
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche			Absendedatum des internationalen Recherchenberichts		
10. März 1999			23/03/1999		
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016			Bevollmächtigter Bediensteter Gurdjian, D		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern iales Aktenzeichen

PCT/DE 98/03155

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	GLINKA A ET AL: "Head induction by simultaneous repression of Bmp and Wnt signalling in Xenopus." NATURE, OCT 2 1997, 389 (6650) P517-9, XP002096087 ENGLAND siehe das ganze Dokument -----	1-10
P,X	GLINKA, ANDREI ET AL: "Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction" NATURE (LONDON) (1998), 391(6665), 357-362 CODEN: NATUAS;ISSN: 0028-0836, XP002096088 siehe das ganze Dokument -----	1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/03155

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 9,10, insoweit bezogen auf ein in Vivo Verfahren sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.